



## Aritma Çamuru ve Gıda Endüstrisi Atıklarından Karanlık Fermentasyon ile Biyohidrojen Üretimi: Substrat Derişiminin Etkisi

Habibe Elif GÜLŞEN AKBAY<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 33133, Mersin, Türkiye

Geliş Tarihi: 09.10.2024

Kabul Tarihi: 03.12.2024

Basım Tarihi: 31.12.2024

Atıf yapmak için: Gülşen Akbay, H.E. (2024). Aritma çamuru ve gıda endüstrisi atıklarından karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretimi: Substrat derişiminin etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 9(4), 623-631. <https://doi.org/10.35229/jaes.1564156>

How to cite: Gülşen Akbay, H.E. (2024). Biohydrogen production from sewage sludge and fruit juice industry wastes by dark fermentation: Effect of various substrate concentrations. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 9(4), 623-631. <https://doi.org/10.35229/jaes.1564156>

 <https://orcid.org/0000-0003-1144-9279>

### \*Sorumlu yazarın:

Habibe Elif GÜLŞEN AKBAY  
Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,  
Çevre Mühendisliği Bölümü, 33133, Mersin,  
Türkiye  
✉: [elifgulsen@mersin.edu.tr](mailto:elifgulsen@mersin.edu.tr)

**Öz:** Organik atıkların yönetiminde elektrik, ısı, biyo-gübre gibi faydalı ürünlerin eldesine imkân sağlayarak, doğal kaynakların sürdürülebilirliğini destekleyen yenilenebilir nitelikteki biyokütle enerjisinin önemi her geçen gün artmaktadır. Karanlık fermentasyon (KF) ile biyokütleden biyohidrojen üretimi sürdürülebilir ve daha temiz bir teknoloji olması ile öne çıkmaktadır. Tamamlayıcı özelliklere sahip birden fazla atığın birlikte fermentasyonu, daha yüksek biyohidrojen verimliliği elde etmek için umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada mevsimlere ve arz-talep ilişkisine bağlı olarak işletme koşulları değişikliği gösterebilen meyve suyu üretimi endüstrisi atıkları (MSA) ve kentsel nitelikli arıtma çamurlarının (KAÇ), KF prosesi önderliğinde farklı substrat karışım oranlarında biyohidrojen üretimine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla biyoreaktörlerdeki karışımların toplam katı madde (TKM) oranı %8 olacak şekilde, KAÇ ve MSA içeriği 50:50,75:25 ve 25:75 olan üç farklı deney seti hazırlanmıştır. Anaerobik biyoreaktörler mezofilik sıcaklıkta kesikli sistemde işletilerek biyogaz/biyohidrojen üretim potansiyeli incelenmiştir. Fermentasyon süresi sonunda biyoreaktördeki KAÇ oranının %25'ten, %50 ve %75'e çıkması ile biyohidrojen üretim potansiyelinin sırası ile %14 ve %39,9 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte tüm biyoreaktörlerde çözünebilir kimyasal oksijen ihtiyacı ( $C_{KOI}$ ) ve karbonhidrat içeriklerinin sırası ile %14-18 ve %54-64 arasında giderildiği tespit edilmiştir. Modifiye Gompertz kinetik modeli tüm biyoreaktörler için deneysel verilere en iyi uyan model ( $R^2 \geq 0,9949$ ) olarak belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyohidrojen, biyokütle, karanlık fermentasyon, organik atık yönetimi, sürdürülebilirlik.

## Biohydrogen Production from Sewage Sludge and Fruit Juice Industry Wastes By Dark Fermentation: Effect of Various Substrate Concentrations

**Abstract:** The importance of renewable biomass energy, which supports the sustainability of natural resources by enabling the production of useful products such as electricity, heat and bio-fertilizer in the management of organic waste, is increasing day by day. Biohydrogen production from biomass via dark fermentation (DF) stands out as a sustainable and cleaner technology. Co-fermentation of multiple wastes with complementary properties is considered a promising approach to achieve higher biohydrogen efficiency. In this study, the effects of fruit juice production industry wastes (MSA) whose operating conditions may vary depending on the seasons and supply-demand relationship and urban sewage sludge (KAÇ), on biohydrogen production at different substrate mixing ratios under the leadership of the DF process were investigated. For this purpose, three different experimental sets were prepared with KAÇ and MSA contents of 50:50, 75:25, and 25:75, so that the total solid matter (TS%) ratio of the mixtures in the bioreactors would be 8%. Biogas/biohydrogen production potential was investigated by operating anaerobic bioreactors in a batch system at mesophilic temperature. It was determined that at the end of the fermentation period, as the KAÇ ratio in the bioreactor increased from 25% to 50% and 75%, the biohydrogen production potential increased by 14% and 39.9%, respectively. Besides, in all bioreactors, soluble chemical oxygen demand (sCOD) and carbohydrate contents were reduced between 14-18% and 54-64%, respectively. The Modified Gompertz equation was determined as the model that best fits the experimental data for all bioreactors ( $R^2 \geq 0,9949$ ).

**Keywords:** Biohydrogen, Biomass, Dark fermentation, Organic waste management, Sustainability.

### GİRİŞ

Hidrojen ( $H_2$ ), doğal gaz olarak da bilinen metanın temiz bir alternatifi olması ve yüksek ısıl değeri (142 kJ/g) nedeniyle ideal bir enerji taşıyıcısıdır. Evrenin toplam

kütlesinin dörtte üçüne katkıda bulunduğu tahmin edilen hidrojen elementi, canlıların neredeyse tüm moleküllerinde bulunmasına rağmen, gaz haline hacimce milyonda birden az rastlanılmaktadır. Günümüzde  $H_2$ , fosil yakıtlardan ve yenilenebilir kaynaklardan üretilmektedir (Abe &

Popoola, 2019). Hidrojen üretim yöntemleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde, yaklaşık %50'sinin doğal gazdan (buhar metan reformasyonu), %30'unun petrol ürünlerinin parçalanmasından, %18'inin kömürün gazlaştırılmasından ve geri kalanının ise suyun elektrolizinden üretildiği görülmektedir (IEA, 2018). Örneğin; 2020 yılında dünya çapında 11 EJ'e (90 Mt) yakın hidrojen üretildiği ve bunun kimya ve rafinaj alt sektörlerinde kullanıldığı belirtilmiştir. Üretilen bu hidrojenin çoğunun doğal gazdan veya kömürden (Çin'de) üretildiği de raporlanmıştır (IEA, 2021). Bu veriler doğrultusunda H<sub>2</sub>'nin ağırlıklı olarak yüksek enerji maliyeti gerektiren ve çevre dostu olmayan fosil yakıtlardan üretildiği sonucu çıkarılabilir. Fakat insanlığın karşılaştığı en acil zorluklardan biri olan ve önemi giderek artan küresel ısınma olgusunu ve etkilerini azaltmak için, sera gazı emisyonlarının özellikle de karbondioksitin (CO<sub>2</sub>) azaltılması gerekmektedir. Bu nedenle hidrojenin yenilenebilir enerji prosesleri ile üretilmesi konusunda gerçekleştirilen araştırmalar olası paydaşlar (politikacılar, endüstriler, araştırma kurumları, yatırımcılar vb.) tarafından desteklenmelidir.

Son zamanlarda, karbonhidrat, protein, lipit ve selüloz/hemiselüloz bakımından zengin organik atıkların karanlık fermantasyon (KF) prosesi yoluyla yenilenebilir nitelikli biyohidrojen üretimine dönüştürülmesine olan ilgi artmıştır (Dong vd., 2009). KF prosesinde, uçucu yağ asitleri (UYA) (örn. asetat, propiyonat, bütirat) ve alkoller, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> gibi diğer metabolitleri üreten hidrolitik, asidojenik ve asetojenik bakteriler dahil olmak üzere farklı anaerobik mikroorganizmalar ile etkileşime girer. Bu prosesinin ilk aşamalarında, organik substratların piruvata oksidasyonu sonucunda nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)+hidrojen (NADH) oluşturulur. NADH: ferredoksin oksidoredüktaz (NFOR) içeren ve indirgenmiş ferredoksin üreten mikrobiyal türler tarafından kullanılabilir (Singh vd., 2021). Daha sonra piruvat asetil-CoA'ya dönüştürülür ve piruvat format liyaz veya asetil-CoA ile formatlanır ve piruvat-ferredoksin oksidoredüktaz (PFOR) yoluyla indirgenmiş ferredoksin ve H<sub>2</sub> üretir (Liu vd., 2017; Zhou vd., 2015). Glikoz glikolizi sürecinde, fermentatif bakterilerdeki sınırlı elektron taşıma zinciri nedeniyle aşırı NADH üretimi meydana gelebilir. Genellikle NADH/NAD<sup>+</sup> oranı, asidojenizasyon aşamasında NADH ve H<sup>+</sup>'nin NAD<sup>+</sup>'a oksidasyonu yoluyla dengede tutulur. NADH'nin yetersiz oksidasyonu, ortamda fazla NADH ve H<sup>+</sup> bulunması ile sonuçlanır. Fermentatif bakteriler, düzenli metabolizmayı sürdürmek için hidrojen üreten fazla NADH'yi oksitlemeye çalışır (Ma vd., 2012). Bunun dışında, asidojenizasyon sırasında asidojenik bakteriler propiyonik asit, bütirik asit, etanol ve diğer organikleri asetik asit ve hidrojene dönüştürebilmektedir (Wainaina vd., 2019). Sonuçta, teorik olarak asetat yolu ile her mol glikoz başına yaklaşık 4 mol H<sub>2</sub>, bütirat yolu ile de 2 mol H<sub>2</sub> üretilir (Sarangi & Nanda,

2020; Vardar-Schara vd., 2008). Bu şekilde biyolojik yollar ile düşük sıcaklık ve atmosferik basınçta üretilen H<sub>2</sub>'nin, teorik olarak daha az enerji yoğunluğu gerektirmesi diğer üretim yöntemlerine göre önemli avantajlar sağlamaktadır.

Organik atıkların, metan ve hidrojen gibi biyokütle enerjisi üretimi amacı ile substrat olarak kullanıldığı bu tür proseslerde günümüzde tek çeşit organik atığın fermantasyonu (mono ya da tekli), dengesiz besin içeriği ve toksik bileşik inhibisyonu gibi substrat özelliklerine bağlı dezavantajları beraberinde getirdiği için daha az tercih edilmektedir. Mono-fermantasyonun sınırlamalarının üstesinden gelmek için, tamamlayıcı özelliklere sahip birden fazla substratın birlikte fermantasyonu (ko-fermantasyon), atık geri dönüşümünün verimliliğini artırarak biyohidrojen üretim performansını geliştiren bir yaklaşım olarak uygulanmaktadır (Hussien vd., 2024; Yang & Wang, 2018). Ko-fermantasyon prosesinin karışımlardaki optimum karbon/azot (C/N) oranını sağlayacak daha dengeli substrat koşulları, eser elementlerin varlığı ve toksik bileşiklerin seyreltilmesi gibi bazı benzersiz avantajları da bulunmaktadır (Zhang vd., 2023).

Evsel ve endüstriyel atıksu arıtma tesislerinde (AAT) üretilen arıtma çamurları (AÇ), büyük miktarda olmaları, yüksek organik madde içerikleri ve teminindeki düşük maliyetler nedeniyle KF prosesi ile biyo-hidrojen üretimi için avantajlı bir substrat olarak değerlendirilmekte ve araştırılmaktadır (Yanga & Wang, 2017). Bununla birlikte, düşük C/N oranı, içeriğindeki karbonhidrat ve yağ oranının az olması ve ağır metaller gibi toksik bileşiklerin varlığından kaynaklı dezavantajlar nedeni ile literatürde AÇ'nin tekli-fermantasyonu genellikle nispeten düşük hidrojen verimi (<8,6 mL/guçucu katı madde (UKM)) ile sonuçlanmıştır (Alemahdi vd., 2015; Miranzadeh vd., 2024; Yang vd., 2019; Yin vd., 2021). Bununla birlikte, AÇ'nin gıda atığı, endüstriyel proses atığı, ormancılık ve tarım atıkları, karbonhidrat açısından zengin atık sular ve ham gliserol dahil olmak üzere diğer organik atıklarla ko-fermantasyonunun biyohidrojen üretim verimliliğini arttırdığı raporlanmıştır (Machhirake vd., 2024).

Bir tür gıda endüstrisi atığı olarak nitelendirilen meyve işleme endüstrisi (meyve suyu, meyve aroması, bebek maması vb. üretimi) katı atıkları yüksek fermente edilebilirlikleri ve biyolojik olarak parçalanabilirlikleri nedeniyle AÇ için ko-fermantasyon substratı olarak umut verici bir seçenektir. Meyve suyu ve püre endüstrisinde ham meyveler parçalanma, pürenin ısıtılması, presleme, durultma, filtrasyon gibi işlemlere tabi tutulmaktadır (Gulsen Akbay vd., 2021). Sonuçta yapılarında fiziksel ve kimyasal değişiklikler meydana gelen yüksek hacimli meyve atıkları oluşmaktadır. Ayrıca meyve kabuğu, tohum, sap ve yaprak gibi farklı organik atıklar da bu endüstrilerde oluşan atıklardandır. Bu atıklar, AÇ'ye oranla yüksek C:N oranına sahiptir ve karbonhidratlar açısından da zengindir (Gulsen

Akbay, 2024). Bununla birlikte, meyve işleme endüstrisi atıkları mikrobiyal metabolizma ve enzimatik sentez için gerekli eser metallere yüksek verimli bir KF prosesi için tek başına yeterli olmayabilir. Arıtma çamuru ise demir (Fe), magnezyum (Mg) ve nikel (Ni) gibi yeterli eser metale sahiptir. Bu nedenle, bu iki tür atığın anaerobik ko-fermantasyon işlemi biyohidrojen üretimini geliştirebilir.

Substrat karakterizasyonu ve özelliklerinin yanı sıra çoklu atık karışımındaki substrat derişimi de KF prosesi ile biyo-hidrojen üretimi için önemli bir parametredir. Substrat konsantrasyonu, karanlık fermentasyonda metabolik yolları ve mikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde etkileyebilir. Bu çalışmada, arıtma çamuru ve meyve işleme endüstrisi atıklarının üç farklı substrat oranında ko-fermantasyonu ile biyogaz üretim potansiyeli araştırılmıştır. Ko-fermantasyon sisteminde biyo-hidrojen üretimi ve organik maddelerin giderimi deneysel olarak incelenmiştir. Ayrıca, kümülatif biyo-hidrojen üretimleri çeşitli kinetik fonksiyonlar ile modellenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

**Substrat Temini:** Çalışmada kullanılan meyve işleme endüstrisi atıkları Karaduvar/Mersin'de faaliyet gösteren bir fabrikadan temin edilmiştir. Substrat içeriği elma (E), nar (N) ve kara havuç (H) suyu/konsantresi üretim prosesinden çıkan katı atıklardan oluşmaktadır. İkincil ana substrat olarak kullanılan arıtma çamuru (AÇ) ve bakteriyel aşı Karaduvar/Mersin'de işletilen kentsel atıksu arıtma tesisi (AAT) anaerobik çürütme ünitesinden temin edilmiştir.

**Tablo 1.** Substrat ve karışımların fizikokimyasal karakterizasyonu.

**Table 1.** Physicochemical characterization of substrates and mixtures.

Parametre	Substrat (katı atıklar)				Karışım		
	E	H	N	KAÇ	%75KAÇ %25MSA	%50KAÇ %50MSA	%25KAÇ %75MSA
pH	3,56	5,44	3,64	8,21	6,09	5,56	5,10
TKM (gTKM/kg <sub>hamatik</sub> )	190	136	266	274	%8	%8	%8
UKM (gUKM/kgTKM)	936	764	686	400	62 g/L	85 g/L	99 g/L
Ç <sub>KOI</sub> (mg/L)	7860	8250	10300	210	8200	10161	11874
Ç <sub>KH</sub> (mg/L)	1448	3440	8354	166	5650	6258	7364

### Deneysel Düzenin Hazırlanması

**Bakteriyel Aşı:** Deney setinde kullanılacak olan nihai bakteriyel aşının (BA) hazırlanması için anaerobik biyoreaktörden temin edilen sıvı çamurun içeriğindeki metanojenlerin inhibe olması amacı ile 80 °C'lik bir etüvde, başlangıç pH:5-6 olacak şekilde 60 dakika süresince ısı muamele ile şoklanması sağlanmıştır. Bu aşamada substratın mevcut pH değeri 1-0,1 M'lık sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) çözeltisi ile ayarlanmıştır. Isıl işlem ile muamele edilen bakteriyel aşı oda sıcaklığına ulaştıktan sonra asidojenlerin gelişimini hızlandırmak için MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (10 mg/L), NH<sub>4</sub>Cl (960 mg/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (120 mg/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (220 mg/L), CaCl<sub>2</sub> (10 mg/L), FeCl<sub>2</sub> (43 mg/L) içeren bir çözelti ortamına (ÇO), BA:ÇO karışım oranı hacimce 2:1 ve toplam hacim 0,9 L olacak şekilde aşılanmıştır (Park vd., 2013). Hazırlanan aşı

Çalışmada kullanılan katı atıklar 60 °C'ye ayarlı etüvde 24 saat süresince kurutulmuştur ve ardından bir desikatörde soğutulmuştur. Ortam sıcaklığına ulaşan atıklar maksimum parçacık boyutu 0,5 mm olacak şekilde laboratuvar tipi öğütücü ile parçalanmıştır ve daha sonraki kullanımlar için desikatörde oda sıcaklığında saklanmıştır. Bunlara ek olarak deneysel çalışmalarda bakteriyel aşı olarak kullanılması amacı ile aynı AAT'de bulunan anaerobik biyoreaktörden aktif çamur temin edilmiştir.

**Substrat Karakterizasyonu:** Substratların ve atık karışımlarının pH'ı standart yöntemler kullanılarak WTW Multimetre pH metre ile tespit edilmiştir (EPA, 2004). Toplam ve uçucu katılar (TKM, UKM) standart yöntemlere göre belirlenmiştir (EPA, 1996; EPA, 2001). Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), kapalı reflaks titrimetrik yöntemle analiz edilmiştir (APHA, 1995). Karbonhidrat (KH) derişimleri fenol sülfirik asit yöntemi ile tayin edilmiştir (Dubois, vd., 1956). KF prosesi için kullanılan substratların ve karışımların fizikokimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Biyoreaktörlerdeki KOİ ve karbonhidrat çözünürlüğü ise daha önce ayrıntıları verilen yöntemle KF prosesi öncesi ve sonrasında belirlenmiştir (Gulşen Akbay vd., 2021). KF sonrası biyoreaktörlerdeki çözünebilir organik madde derişimindeki (Ç<sub>OM</sub>) azalma (Ç<sub>OM</sub>: Ç<sub>KOI</sub> ve çözünür karbonhidrat (Ç<sub>KH</sub>)) Eşitlik (1) ile hesaplanmıştır.

$$\text{Ç}_{OM} \text{ Giderimi (\%)} = \frac{(\text{Ç}_{OM} \text{ giriş} - \text{Ç}_{OM} \text{ fermente})}{\text{Ç}_{OM} \text{ giriş}} \times 100 \quad (1)$$

kültürü anaerobik-mezofilik ortamda iki gün bekletildikten sonra biyo-hidrojen üretimi aşaması için kullanıma hazır nihai bakteriyel aşı haline gelmiştir.

**Karanlık Fermentasyon:** Hesaplanan oranlarda katı atıklar 125 ml hacme sahip kauçuk septumlu cam biyoreaktörlere eklenmiştir. Bu aşamada üç farklı meyve işleme atığı eşit oranlarda karışıma eklenmiştir. Biyoreaktörlerdeki atık bileşimleri (%75MSA-%25KAÇ, (%50MSA-%50KAÇ ve %25MSA-%75KAÇ) başlangıç TKM oranı %8 olacak şekilde musluk suyu ve bakteriyel aşı ile seyreltilmiştir. Bu amaçla her karışıma 46 mL musluk suyu ve 4 mL bakteriyel aşı eklenmiştir. Hazırlanan karışımların başlangıç pH değerleri %75, %50 ve %25 MSA içeren biyoreaktörler için sırası ile yaklaşık olarak 5,00;5,50 ve pH:6,00 olarak belirlenmiştir. Literatürde, KF'nin optimum mikrobiyal büyüme ve

aktivite için 5,0 ila 7,0 aralığında optimum bir çalışma pH'ına ihtiyaç duyduğu bildirilmektedir (Li & Fang, 2007). Bu nedenle tüm karışımlar, kimyasal giderimini önlemek ve doğal süreci gözlemlemek amacı ile kendi pH değerlerinde ayarlama yapılmadan deneysel sürece dahil edilmiştir. Böylece karanlık fermantasyon için gerekli olan zayıf asidik şartlar kendiliğinden sağlanmıştır ve kimyasal maliyeti oluşmamıştır. Biyoreaktörler kapakları kapatılarak sızdırmazlığı sağlamak üzere parafilm ve koli bandı ile sıkı bir şekilde sarılmıştır. Oksijenin tamamen uzaklaştırılması amacı ile şişelere yaklaşık 2 dakika süresince azot gazı verilmiştir. Biyoreaktör içerisindeki gazın tahliyesi için ikinci bir enjektör iğnesi kullanılmıştır. Anaerobik ortam koşulları sağlanan şişeler, sıcaklığı  $36 \pm 1$  °C'ye ayarlanmış inkübatöre yerleştirilmiştir. Karışımların biyogaz/biyohidrojen üretim potansiyeli kesikli sistemde 5 gün süre ile günlük olarak incelenmiştir. Tüm deneyler iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 2.3.3. Biyogaz ve Biyohidrojenin Analizi

Üretilen biyogaz hacmi, su yer değiştirme metodu ile ölçülmüştür. Bu yöntem kullanılarak, reaktör baş boşluğunda biriken biyogaz, sıvıya gazın dağılmasını önlemek için, asitlendirilmiş (pH <3) ve tuzlu su (NaCl% 25) çözeltisi ile dolu ikinci bir şişeye enjektör iğnesine bağlı boru sistemi ile taşınmıştır. İkinci şişeye salınan biyogaz, şişenin bağlantılı olduğu dereceli cam büretten eşit hacimde sıvıyı azaltmıştır. Böylece dereceli bürette gerçekleşen hacimsel azalma ile üretilen biyogaz miktarı günlük olarak ölçülmüştür (Alibardi & Cossu, 2016). Hacmi bilenen biyogazın hidrojen gazı içeriği, bir termal iletkenlik dedektörü (TCD) ile moleküler elek 5A özellikli  $1,83 \text{ m} \times 3,18 \text{ mm}$  (iç çap) paslanmaz çelik kolon kullanılarak donatılmış gaz kromatografisi (GC, Agilent) cihazı ile belirlenmiştir. Enjektör, fırın ve dedektörün çalışma sıcaklıkları sırasıyla 30 °C, 30°C ve 100 °C'ye sabitlenmiştir. Taşıyıcı gaz olarak  $5 \text{ mL.dak}^{-1}$  akış hızında helyum kullanılmıştır.

### 2.4. Kinetik Modelleme Çalışmaları

Deneysel çalışmalarda elde edilen kümülatif biyohidrojen üretim değerleri dört farklı denklem (Modifiye Gompertz (MG), Monod Kinetiği (MK), Transfer Fonksiyonu (TF) ve Lojistik Fonksiyonu (LF)) kullanılarak OriginPro-2021 yazılımı ile modellenmiştir. Bu modeller genel olarak kümülatif biyohidrojen verimini, maksimum hidrojen üretim hızı, fermantasyon süresi ve biyohidrojen üretiminin gecikme fazı süresinin bir fonksiyonu olarak tahmin edebilmektedir. Doğrusal olmayan kinetik model sonuçlarının (teorik değer) deneysel biyohidrojen üretim değerlerine (gerçek değer) uygunluğunu ve yakınlığını yorumlamak için korelasyon katsayıları ( $R^2$ ) ve model başarısı hakkında tahminlerde bulunmak için, Eşitlik (2) ile "Kök Ortalama Karesel Hata (RMSE)" değerleri belirlenmiştir (Kriswantoro & Chu,

2024). Çalışmada kullanılan modellere ait matematiksel formüller Tablo 2'de verilmiştir.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (V_{teo,i} - V_{den,i})^2}{N}} \quad (2)$$

Burada  $V_{teo,i}$  model tarafından tahmin edilen,  $V_{den,i}$  ise KF deneylerinde hesaplanan biyohidrojen verimidir. Ayrıca, "N" veri noktaları kümesini temsil etmektedir.

**Tablo 2.** Kinetik modellemede kullanılan eşitlikler.

Model	Eşitlik	Kaynak
MG	$BH(t) = NH \cdot \exp(-\exp(-Rh \cdot 2,7183 / NH) \cdot (\lambda \cdot t + 1))$	(Córdova vd., 2022)
MK	$BH(t) = NH \cdot (k \cdot t) / (1 + (k \cdot t))$	(Koch vd., 2017)
TF	$BH(t) = NH \cdot \{1 - \exp(-Rh \cdot (t - \lambda)) / NH\}$	(Ren vd., 2023)
LF	$BH(t) = NH / (1 + \exp\{4Rh \cdot (\lambda \cdot t) / NH + 2\})$	(Taşkan vd., 2022)

Tablo 2'de verilen eşitliklerde yer alan kısaltmalar; BH(t): Toplam biyohidrojen üretimi ( $\text{mLH}_2/\text{gUKM}$ ), NH: Nihai biyohidrojen üretim potansiyeli ( $\text{mLH}_2/\text{gUKM}$ ), Rh: maksimum biyohidrojen üretim hızı ( $\text{mLH}_2/\text{gUKM.gün}$ ), k: hız sabiti ( $\text{gün}^{-1}$ ),  $\lambda$ : gecikme fazı süresi (gün),  $\exp(1) = 2,7183$

## BULGULAR VE TARTIŞMA

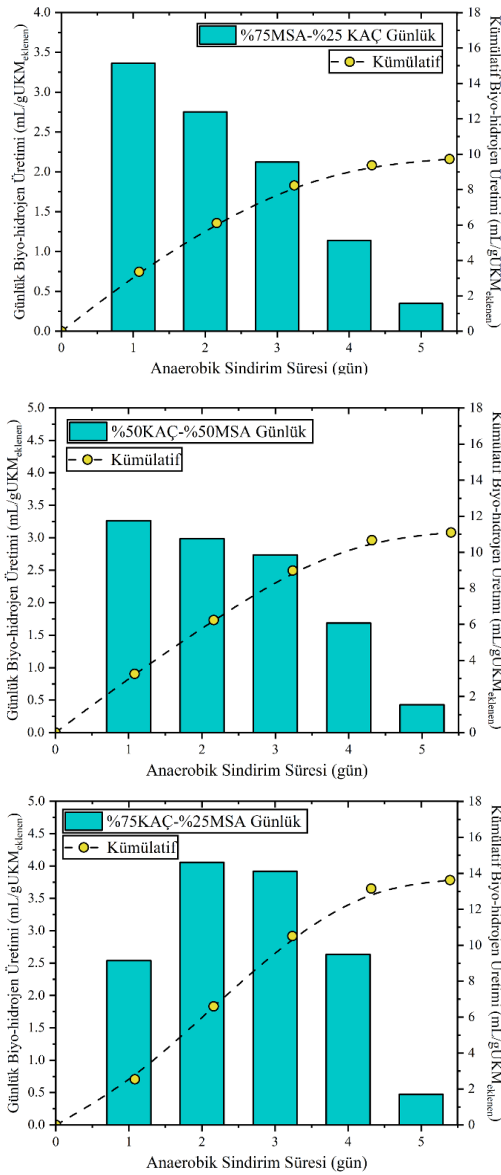
Bu çalışmada, meyve işleme endüstrisi atıklarından oluşan biyokütle ve kentsel AAT arıtma çamurlarının çeşitli oranlarında kesikli işletme ile biyohidrojen üretim potansiyeli değerlendirilmiştir. Biyoreaktörlerde oluşan günlük ve kümülatif biyohidrojen üretimi Şekil 1'de verilmiştir.

Şekil 1 incelendiğinde MSA içeriği daha fazla olan biyoreaktörlerde biyohidrojen üretim prosesinin daha hızlı bir şekilde başladığı ve akabinde MSA oranının yoğunluğuna bağlı olarak daha keskin bir düşüşe geçtiği görülmüştür. Bununla birlikte ortalama 5 gün içerisinde tüm biyoreaktörlerdeki biyohidrojen üretiminin neredeyse sona erdiği belirlenmiştir. 5 günlük fermantasyon süresi sonucunda %75, %50 ve %25 MSA içeren biyoreaktörlerde üretilen biyohidrojen hacmi sırası ile 48,05; 47,28 ve 42,23 mL olmuştur. Şekil 2'de anaerobik proses sonucunda biyoreaktörlerde üretilen kümülatif biyogaz potansiyeli ve biyohidrojen içeriği verilmiştir.

Hidrojen verimi parametresi, hidrojen fermantasyon verimliliğini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 1'de KAÇ'nin karışımdaki substrat konsantrasyonu %25'ten %75'e çıkarıldığında biyohidrojen veriminin  $9,73 \text{ mL/gUKM}_{eklenen}$ 'den  $13,62 \text{ mL/gUKM}'ye$  yükseldiği görülebilir. Fermantasyon süresi sonunda biyoreaktördeki KAÇ oranının %25'ten %50 ve %75'e çıkması ile biyohidrojen üretim potansiyelinin sırası ile %14 ve %39,9 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir. Biyoreaktördeki arıtma çamuru derişimi arttıkça biyohidrojen üretim veriminin artması fermentatif bakterilerin metabolik aktivitesinin ve fermentatif bakterilerin indüklenebilir enzimler salgılama yeteneğinin



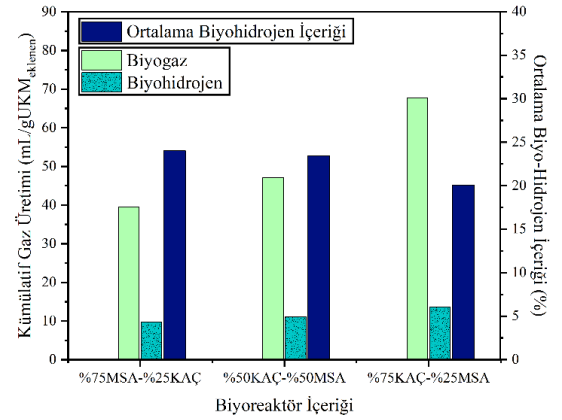
artması olabilir (Yang & Wang, 2019). Substratların UKM değeri arttıkça organik madde muhtevasının da arttığı bilinmektedir. Tablo 1 incelendiğinde meyve atıklarının UKM oranının arıtma çamuruna oranla daha fazla olduğu görülmektedir. Karışımlar aynı TKM oranı ile hazırlanmış olsa da UKM içeriğindeki bu farklılık nedeni ile sonuçlar organik madde bakımından değişiklik gösterebilmektedir. Bu da karışımlardaki meyve atıkları oranı arttıkça biyoreaktörün organik madde içeriğinin de diğerlerine oranla artmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak bu durum biyoreaktörde organik asitlerin (örn. asetat, propionat, bütirat ve laktat) birikmesine ve pH'ın düşmesine neden olabilir, bu da  $NAD^+/NADH$ 'nin dinamik dengesini bozar ve fermentasyon bakterilerinin metabolik aktivitesinin azalmasına neden olmuş olabilir (Sato vd., 2015).



**Şekil 1.** Farklı MSA:KAÇ oranlarında hazırlanan karışımların günlük ve kümülatif biyohidrojen üretim potansiyeli.

**Figure 1.** Daily and cumulative biohydrogen production potential of mixtures prepared at different MSA:KAÇ ratios.

KF prosesi sonucu biyoreaktörlerdeki çıkış pH değerleri %75KAÇ, %50KAÇ ve %25KAÇ için sırası ile 5,32; 4,72 ve 4,56 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar ortamdaki muhtemel asitleşmeyi desteklemektedir. Ayrıca, yüksek organik madde derişiminin fermentasyon ortamında hidrojen kısmi basıncının da yükselmesine neden olabileceği ve bunun da hidrojen üretim verimliliğini sınırlandırabileceği bildirilmiştir (Hawkes vd., 2002). Tablo 3'te arıtma çamurunun tekli-fermentasyonu ve diğer atıklar ile ko-fermentasyonu sonucu üretilen biyohidrojen miktarları karşılaştırılmıştır.



**Şekil 2.** Toplam biyohidrojen içeriği ve kümülatif biyogaz üretimi.

**Figure 2.** The overall biohydrogen content and cumulative biogas production.

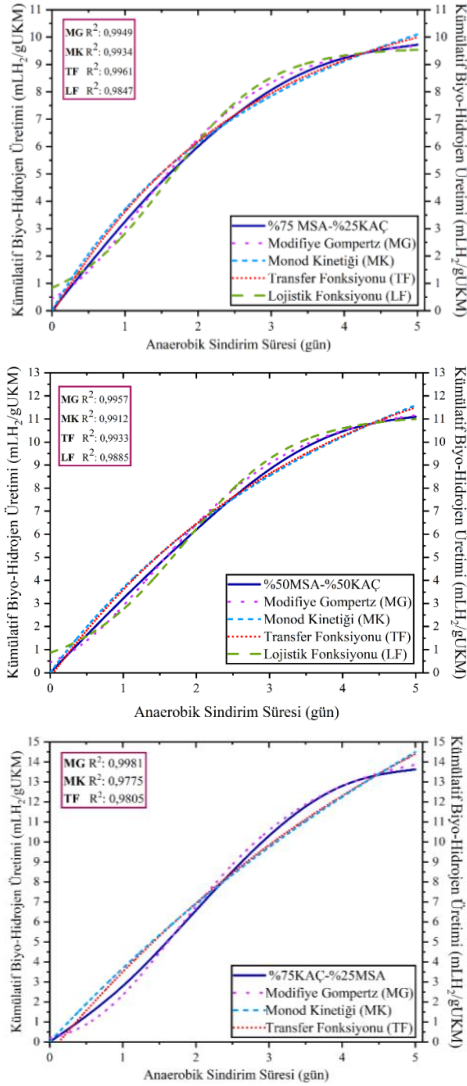
**Tablo 3.** Arıtma çamuru (AÇ) ve organik atıkların KF proseslerinde substrat olarak kullanılmasıyla elde edilen maksimum biyohidrojen verimine ilişkin literatür verileri

**Table 3.** Literature data on maximum biohydrogen yield obtained by using sewage sludge (AÇ) and organic waste as substrate in DF processes.

Substrat	KF Şartları	Biyohidrojen verimi	Kaynak
AÇ, alkali ön işlem	Kesikli, 37 °C	11,68 mL/gUKM <sub>eklenen</sub>	(Xiao & Liu, 2009)
AÇ, termal ön işlem	Kesikli, 37 °C	12,23 mL/gUKM <sub>eklenen</sub>	(Xiao & Liu, 2006)
AÇ ve pirinç küspesi	Kesikli, 37 °C	14,96 mL/gUKM <sub>eklenen</sub>	(Alemahdi vd., 2015)
AÇ ve mısır küspesi	Kesikli, 37 °C	13,40 mL/gUKM <sub>eklenen</sub>	(Liu vd., 2013)
Meyve, sebze atıkları	Kesikli, 55 °C	20,81 mL/gUKM <sub>eklenen</sub>	(Abubackar vd., 2019)
AÇ, vinas, kanatlı gübresi	Kesikli, 55 °C	27,1 mL/gUKM <sub>eklenen</sub>	(Sillero vd., 2023)
MSA ve KAÇ	Kesikli, 37 °C	13,62 mL/gUKM <sub>eklenen</sub>	Bu çalışma

Tablo 3 incelendiğinde, mevcut çalışmadaki maksimum hidrojen veriminin (13,62 mL/gUKM<sub>eklenen</sub>), kesikli sistemde işletilen ve organik madde hidrolizi çeşitli ön işlemler ile artırılan arıtma çamurlarının tekli karanlık fermentasyonuna (11,68–12,23 mL/gUKM<sub>eklenen</sub>) kıyasla daha yüksek olduğu görülebilir. Bununla birlikte arıtma çamurunun farklı organik atıklar ile ko-fermentasyonunun, tekli-fermentasyonlarına kıyasla hidrojen üretimini artırabileceği gözlemlenmektedir; bunun nedeni, ko-fermentasyon sistemlerinin fermentasyon bakterileri için daha iyi C:N oranı ve daha dengeli besin koşulları sağlaması olabilir (Feng vd., 2011). Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen biyohidrojen üretimi sonuçlarının genel olarak literatür verileri ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte KF sonunda %75KAÇ, %50KAÇ ve %25KAÇ içeren biyoreaktörlerde  $\chi_{KOI}$  giderimleri sırası ile %18, %16 ve %14 iken  $\chi_{KH}$

giderimleri sırası ile %64, %57 ve %54 olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 3. Biyorektörlerde oluşan kümülatif biyohidrojen üretim verimlerinin uydurulmuş kinetik eğrileri.

Figure 3. Fitted kinetic curves of cumulative biogas production yields in bioreactors.

Substratların çoklu-fermentasyonunda yer alan mikrobiyal toplulukların kinetik davranışı hakkında daha derin bir anlayış kazanmak ve KF prosesinin kinetik davranışını tanımlamak için Modifiye Gompertz (MG), Monod Kinetiği (MK), Transfer Fonksiyonu (TF) ve Lojistik Fonksiyonu (LF) kullanılmıştır. Farklı oranlarda substrat karışımı koşullarında nihai biyohidrojen üretim potansiyeli, maksimum biyohidrojen üretim hızı ve gecikme fazı süresi gibi kinetik parametrelerin eğri uydurma hesaplamalarının sonuçları Tablo 4'te verilmiştir. Ek olarak, Şekil 3'te hem deneysel verileri hem de kümülatif biyohidrojen üretimi için modellenmiş sonuçlar gösterilmiştir. Kinetik modelleme sonuçlarına göre biyohidrojen üretim veriminin modellenmesinde kullanılacak en uygun fonksiyonun tüm substrat derişimleri için MG olduğu belirlenmiştir. Bu

değerlendirme yapılırken literatür uyarınca, yüksek  $R^2$  ve düşük RMSE değerlerinin yanı sıra, biyohidrojen üretiminde deneyler ve model ile elde edilen teorik veriler arasındaki farkın %25'ten az olması koşulu dikkate alınmıştır (Kainthola vd., 2019). Bununla birlikte LF modeli %75-%50 MSA içeren biyoreaktörler ile yüksek uyumluluk gösterirken %25MSA içeren bioreaktörden elde edilen veriler ile uyumlu olmadığı belirlenmiştir. Monod modelinin bu çalışmadan elde edilen deneysel verilerle uyumlu bir eğri oluştursa da deneysel ve teorik veriler arasındaki yüksek fark nedeniyle kullanılabilir olmadığı sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni karışımlardaki yüksek substrat konsantrasyonu nedeni ile hidrojen üretimi sağlayan kültürlerin büyüme kinetiğinin belirlenmesinin zor olmasıdır (Chai vd., 2021).

Tablo 4. Farklı substrat derişimlerinde biyohidrojen üretimi için kinetik parametreler.

Table 4. Kinetic parameters for biogas production at different substrate concentrations.

Model	Parametre	%75MSA %25KAÇ	%50MSA %50KAÇ	%25MSA %75KAÇ
MG	BH(t) mL/gUKM	9,50	10,69	13,05
	BH(e) mL/gUKM	9,73	11,10	13,62
	Fark (%)	2,42	3,83	4,36
	NH mL/gUKM	9,93	11,69	14,70
	Rh mL/gUKM.gün	3,49	3,65	4,65
	$\lambda$ (gün)	0,13	0,21	0,54
	RMSE	0,295	0,402	0,520
	Adj R <sup>2</sup>	0,9916	0,9929	0,9969
MK	BH(t) mL/gUKM	5,49	5,09	3,53
	BH(e) mL/gUKM	9,73	11,10	13,62
	Fark (%)	77,23	118,07	285,83
	NH mL/gUKM	17,72	25,06	54,31
	k (gün <sup>-1</sup> )	0,26	0,17	0,07
	RMSE	3,544	4,817	7,728
	Adj R <sup>2</sup>	0,9918	0,9890	0,9719
	TF	BH(t) mL/gUKM	8,72	9,45
BH(e) mL/gUKM		9,73	11,10	13,62
Fark (%)		11,58	17,46	27,28
NH mL/gUKM		11,81	15,34	25,97
Rh mL/gUKM.gün		4,44	4,28	4,30
$\lambda$ (gün)		0,02	0,04	0,12
RMSE		0,856	1,330	2,356
Adj R <sup>2</sup>		0,9935	0,9888	0,9676
LF	BH(t) mL/gUKM	9,65	10,95	-
	BH(e) mL/gUKM	9,73	11,10	13,62
	Fark (%)	0,82	1,36	-
	NH mL/gUKM	9,60	11,14	-
	Rh mL/gUKM.gün	3,52	3,78	-
	$\lambda$ (gün)	0,23	0,35	-
	RMSE	0,477	0,471	-
	Adj R <sup>2</sup>	0,9745	0,9809	-

Tablo 4'te gösterilen kinetik parametreler incelendiğinde maksimum biyohidrojen üretim hızı (Rh) değerlerinin MG modeli için biyoreaktördeki KAÇ oranı arttıkça arttığı görülmektedir. Bununla birlikte KF prosesinde organik madde hidrolizini gerçekleştiren mikroorganizmaların gecikme fazını ifade eden " $\lambda$ " değerinin biyoreaktördeki MSA değeri arttıkça kısaldığı görülmektedir. Bu durum MSA'nın fazlaca olduğu ortamda bulunan mikroorganizmaların ortamda bulunan organik maddeleri biyohidrojen üretiminden daha çok üreme, gelişme ve ortama uyum sağlama faaliyetleri için kullanmasından kaynaklı olabilir. Bu durum deneysel sonuçlarda KAÇ oranı fazla olan biyoreaktörde daha fazla biyohidrojen üretilmesi ile de uyumludur.

## SONUÇ

Bu çalışma, meyve işleme endüstrisi atıkları ve kentsel arıtma çamurlarının karanlık ko-fermantasyon prosesi ile biyohidrojen üretim performansının anlaşılmasında karışımdaki substrat derişimlerinin netleştirilmesine yardımcı olacaktır. Tüm biyoreaktörlerde üretilen biyogazların ortalama biyohidrojen içerikleri %20-%24 arasında değişim gösterirken MSA içeriği yüksek olan biyoreaktörlerde bu oranın daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte biyoreaktörlerdeki arıtma çamuru oranı arttıkça biyogaz üretimindeki artışa bağlı olarak biyohidrojen üretiminin de arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte biyoreaktörlerdeki yüksek organik madde derişimlerinin fermentasyon sürecinde ortamın pH değerini düşürebildiği ve bunun da mikroorganizmaların metabolik aktivitesini inhibe ederek biyohidrojen üretiminin azalmasına yol açabileceği belirlenmiştir. Bu nedenle bu tür bir teknolojiyi benzer biyokütle ile daha büyük ölçekte tasarlarırken, bertarafı önem ve öncelik arz eden atıkların organik madde miktarına bağlı olarak karışımların tasarlanabileceği dikkate alınmalıdır.

## TEŞEKKÜR

Proje Numarası: 2023-1-API-4855 olan bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abe, J.O., Popoola, A.P.I., Ajenifuja, E. & Popoola, O.M. (2019).** Hydrogen energy, economy and storage: Review and recommendation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **44**(29), 15072-15086. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2019.04.068](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.068)
- Abubackar, H.N., Keskin, T., Yazgin, O., Gunay, B., Arslan, K. & Azbar, N. (2019).** Biohydrogen production from autoclaved fruit and vegetable wastes by dry fermentation under thermophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, **44**(34), 18776-18784. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2018.12.068](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.12.068)
- Alemahdi, N., Che Man, H., Abd Rahman, N., Nasirian, N. & Yang, Y. (2015).** Enhanced mesophilic biohydrogen production of raw rice straw and activated sewage sludge by co-digestion. *International Journal of Hydrogen Energy*, **40**(46), 16033-16044. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2015.08.106](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.106)
- Alibardi, L. & Cossu, R. (2016).** Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management*, **47**, 69-77. DOI: [10.1016/j.wasman.2015.07.049](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049)
- APHA. (1995).** Standard methods for the examination of water and wastewater (16th ed.). Washington.
- Chai, A., Wong, Y.S., Ong, S.A., Aminah Lutpi, N., Sam, S.T., Kee, W.C. & Ng, H.H. (2021).** Haldane-Andrews substrate inhibition kinetics for pilot scale thermophilic anaerobic degradation of sugarcane vinasse. *Bioresource Technology*, **336**, 125319. DOI: [10.1016/j.biortech.2021.125319](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125319)
- Córdova-Lizama, A., Carrera-Figueiras, C., Palacios, A., Castro-Olivera, P.M. & Ruiz-Espinoza, J. (2022).** Improving hydrogen production from the anaerobic digestion of waste activated sludge: Effects of cobalt and iron zero valent nanoparticles. *International Journal of Hydrogen Energy*, **47**(70), 30074-30084. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2022.06.187](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.06.187)
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K. & Yu, Z. (2009).** Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**(2), 812-820. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2008.11.031](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.031)
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.
- EPA. (1996).** Method 2540B and 2540E, Test Methods for Eva2001ing Solid Waste Physical/Chemical Methods, SW-846, 3r.
- EPA. (2001).** Method 1684, Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids, U.S.
- EPA. (2004).** Method 9045D, Soil and Waste pH, part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. In Hazardous Waste Test Methods / SW-846, 1-5.
- Feng, L., Yan, Y. & Chen, Y. (2011).** Co-fermentation of waste activated sludge with food waste for short-chain fatty acids production: Effect of pH at ambient temperature. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, **5**(4), 623-632. DOI: [10.1007/S11783-011-0334-2](https://doi.org/10.1007/S11783-011-0334-2)
- Gulsen Akbay, H.E. (2024).** Anaerobic mono and co-digestion of agro-industrial waste and municipal sewage sludge: Biogas production potential, kinetic modelling, and digestate characteristics. *Fuel*, **355**, 129468. DOI: [10.1016/j.fuel.2023.129468](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.129468)
- Gulsen Akbay, H.E., Dizge, N. & Kumbur, H. (2021).** Enhancing biogas production of anaerobic co-

- digestion of industrial waste and municipal sewage sludge with mechanical, chemical, thermal, and hybrid pretreatment. *Bioresource Technology*, **340**, 125688. DOI: [10.1016/j.biortech.2021.125688](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125688)
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. & Hussy, I. (2002).** Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1339-1347. DOI: [10.1016/s0360-3199\(02\)00090-3](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(02)00090-3)
- Hussien, M., Jadhav, D.A., Le, T.T.Q., Jang, J.H., Jang, J.K. & Chae, K.J. (2024).** Tuning dark fermentation operational conditions for improved biohydrogen yield during co-digestion of swine manure and food waste. *Process Safety and Environmental Protection*, **187**, 1496-1507. DOI: [10.1016/j.psep.2024.05.068](https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.05.068)
- IEA, International Energy Agency, (2018).** World Energy Outlook 2018. (24 Mayıs 2024)
- IEA, International Energy Agency, (2021).** World Energy Outlook 2021. (24 Mayıs 2024)
- Kainthola, J., Kalamdhad, A.S., Goud, V.V. & Goel, R. (2019).** Fungal pretreatment and associated kinetics of rice straw hydrolysis to accelerate methane yield from anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **286**, 121368. DOI: [10.1016/j.biortech.2019.121368](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121368)
- Koch, K., Lippert, T. & Drewes, J.E. (2017).** The role of inoculum's origin on the methane yield of different substrates in biochemical methane potential (BMP) tests. *Bioresource Technology*, **243**, 457-463. DOI: [10.1016/j.biortech.2017.06.142](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.142)
- Kriswantoro, J.A. & Chu, C.Y. (2024).** Biohydrogen production kinetics from cacao pod husk hydrolysate in dark fermentations: Effect of pretreatment, substrate concentration, and inoculum. *Journal of Cleaner Production*, **434**, 140407. DOI: [10.1016/j.jclepro.2023.140407](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140407)
- Li, C. & Fang, H.H.P. (2007).** Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **37**(1), 1-39. DOI: [10.1080/10643380600729071](https://doi.org/10.1080/10643380600729071)
- Liu, D., Li, R.Y., Ji, M. & Cai, Y.M. (2013).** Enhanced hydrogen and methane production from sewage sludge by addition of cornstalk in two-stage fermentation process. *Asian Journal of Chemistry*, **25**(12), 6535-6539. DOI: [10.14233/ajchem.2013.14347](https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.14347)
- Liu, D., Sun, Y., Li, Y. & Lu, Y. (2017).** Perturbation of formate pathway and NADH pathway acting on the biohydrogen production. *Scientific Reports*, **7**(1), 1-8. DOI: [10.1038/s41598-017-10191-7](https://doi.org/10.1038/s41598-017-10191-7)
- Ma, K., Zhao, H., Zhang, C., Lu, Y. & Xing, X.H. (2012).** Impairment of NADH dehydrogenase for increased hydrogen production and its effect on metabolic flux redistribution in wild strain and mutants of *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(21), 15875-15885. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2012.08.017](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.017)
- Machhirake, N.P., Vanapalli, K.R., Kumar, S. & Mohanty, B. (2024).** Biohydrogen from waste feedstocks: An energy opportunity for decarbonization in developing countries. *Environmental Research*, **252**, 119028. DOI: [10.1016/j.envres.2024.119028](https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119028)
- Miranzadeh, M.B., Jafarsalehi, M., Akram, J., Ebrahimi, M., Mazaheri, A. & Mashayekh, M. (2024).** Boosting biogas production in the wastewater treatment plants: A narrative review on co-digestion of sewage sludge with internal and external organic waste. *Bioresource Technology Reports*, **26**, 101856. DOI: [10.1016/j.biteb.2024.101856](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101856)
- Park, J.H., Cheon, H.C., Yoon, J.J., Park, H.D. & Kim, S.H. (2013).** Optimization of batch dilute-acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, **38**(14), 6130-6136. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2013.01.050](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.050)
- Ren, Y., Tang, S., Hong, F., Jiang, W., Liu, Z., Lu, H., ... & Si, B. (2023).** Effects of milli-magnetite on biohydrogen production from potato peels: Insight of metabolism mechanisms. *Fuel*, **348**, 128576. DOI: [10.1016/j.fuel.2023.128576](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.128576)
- Sarangi, P.K. & Nanda, S. (2020).** Biohydrogen Production Through Dark Fermentation. *Chemical Engineering & Technology*, **43**(4), 601-612. DOI: [10.1002/ceat.201900452](https://doi.org/10.1002/ceat.201900452)
- Sato, O., Suzuki, Y., Sato, Y., Sasaki, S. & Sonoki, T. (2015).** Water-insoluble material from apple pomace makes changes in intracellular NAD<sup>+</sup>/NADH ratio and pyrophosphate content and stimulates fermentative production of hydrogen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **119**(5), 543-547. DOI: [10.1016/j.jbiosc.2014.10.017](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.10.017)
- Sillero, L., Solera, R. & Perez, M. (2023).** Effect of temperature on biohydrogen and biomethane production using a biochemical potential test with different mixtures of sewage sludge, vinasse and poultry manure. *Journal of Cleaner Production*, **382**, 135237. DOI: [10.1016/j.jclepro.2022.135237](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135237)



- Singh, T., Alhazmi, A., Mohammad, A., Srivastava, N., Haque, S., Sharma, S., ... & Gupta, V.K. (2021).** Integrated biohydrogen production via lignocellulosic waste: Opportunity, challenges & future prospects. *Bioresource Technology*, *338*, 125511. DOI: [10.1016/j.biortech.2021.125511](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125511)
- Taşkan, B., Köroğlu, E.O. & Taşkan, E. (2022).** Cladophora sp. as a sustainable feedstock for dark fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *47*(34), 15410-15418. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2022.03.024](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.03.024)
- Vardar-Schara, G., Maeda, T. & Wood, T.K. (2008).** Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial Biotechnology*, *1*(2), 107. DOI: [10.1111/J.1751-7915.2007.00009.x](https://doi.org/10.1111/J.1751-7915.2007.00009.x)
- Wainaina, S., Lukitawesa, Kumar Awasthi, M. & Taherzadeh, M.J. (2019).** Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered*, *10*(1), 437. DOI: [10.1080/21655979.2019.1673937](https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937)
- Xiao, B.Y. & Liu, J.X. (2006).** Effects of thermally pretreated temperature on bio-hydrogen production from sewage sludge. *Journal of Environmental Sciences*, *18*(1), 6-12.
- Xiao, B. & Liu, J. (2009).** Effects of various pretreatments on biohydrogen production from sewage sludge. *Chinese Science Bulletin*, *54*(12), 2038-2044. DOI: [10.1007/S11434-009-0100-z](https://doi.org/10.1007/S11434-009-0100-z)
- Yang, G. & Wang, J. (2017).** Fermentative hydrogen production from sewage sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *47*(14), 1219-1281. DOI: [10.1080/10643389.2017.1348107](https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1348107)
- Yang, G. & Wang, J. (2018).** Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *95*, 130-146. DOI: [10.1016/j.rser.2018.07.029](https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.029)
- Yang, G., Hu, Y. & Wang, J. (2019).** Biohydrogen production from co-fermentation of fallen leaves and sewage sludge. *Bioresource Technology*, *285*, 121342. DOI: [10.1016/j.biortech.2019.121342](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121342)
- Yang, G. & Wang, J. (2019).** Biohydrogen production by co-fermentation of sewage sludge and grass residue: Effect of various substrate concentrations. *Fuel*, *237*, 1203-1208. DOI: [10.1016/j.fuel.2018.10.026](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.10.026)
- Yin, Y., Chen, Y. & Wang, J. (2021).** Co-fermentation of sewage sludge and algae and Fe<sup>2+</sup> addition for enhancing hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(13), 8950-8960. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2021.01.009](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.01.009)
- Zhang, H., Fu, Z., Guan, D., Zhao, J., Wang, Y., Zhang, Q., ... & Wang, D. (2023).** A comprehensive review on food waste anaerobic co-digestion: Current situation and research prospect. *Process Safety and Environmental Protection*, *179*, 546-558. DOI: [10.1016/j.psep.2023.09.030](https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.09.030)
- Zhou, J., Olson, D.G., Lanahan, A.A., Tian, L., Murphy, S.J.L., Lo, J. & Lynd, L.R. (2015).** Physiological roles of pyruvate ferredoxin oxidoreductase and pyruvate formate-lyase in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 1-14. DOI: [10.1186/s13068-015-0304-1](https://doi.org/10.1186/s13068-015-0304-1)